

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005182

International filing date: 23 March 2005 (23.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-089620
Filing date: 25 March 2004 (25.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

14.4.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 3 月 2 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 8 9 6 2 0
Application Number:

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号

The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

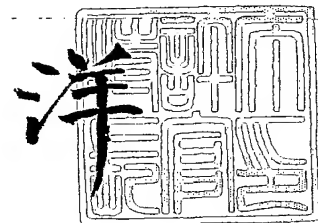
J P 2 0 0 4 - 0 8 9 6 2 0

出 願 人 日本メジフィジックス株式会社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 4 月 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 DA-03635
【提出日】 平成16年 3月25日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 51/00
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市北袖 3 番地 1 日本メジフィジックス株式会社内
 【氏名】 川口 敬義
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市北袖 3 番地 1 日本メジフィジックス株式会社内
 【氏名】 関 育也
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県袖ヶ浦市北袖 3 番地 1 日本メジフィジックス株式会社内
 【氏名】 前村 万里野
【特許出願人】
 【識別番号】 000230250
 【氏名又は名称】 日本メジフィジックス株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100066692
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 浅村 皓
【選任した代理人】
 【識別番号】 100072040
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 浅村 肇
【選任した代理人】
 【識別番号】 100088926
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長沼 暉夫
【選任した代理人】
 【識別番号】 100102897
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 池田 幸弘
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 002901
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

金属標識可能なペプチド及び医薬品添加物として許容されうる塩基性有機化合物を含有することを特徴する医療用組成物。

【請求項 2】

水系溶媒に不溶もしくは難溶である金属標識可能なペプチドを、医薬品添加物として許容されうる塩基性有機化合物と共に水系溶媒に溶解させることにより得られる請求項 1 に記載の医療用組成物。

【請求項 3】

塩基性有機化合物が塩基性アミノ酸又はイミダゾール環を有する塩基性化合物である請求項 1 又は 2 に記載の医療用組成物。

【請求項 4】

塩基性アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン及びリジンから選択される 1 種以上である請求項 3 に記載の医療用組成物。

【請求項 5】

イミダゾール環を有する塩基性化合物が、イミダゾールである請求項 3 に記載の医療用組成物。

【請求項 6】

金属標識可能なペプチドが診断薬もしくは治療用医薬品の有効成分として利用可能なペプチドである請求項 1 から 5 のいずれかに記載の医療用組成物。

【請求項 7】

金属標識可能なペプチドがアミノ酸 30 残基以下又は分子量 4500 以下である請求項 1 から 6 のいずれかに記載の医療用組成物。

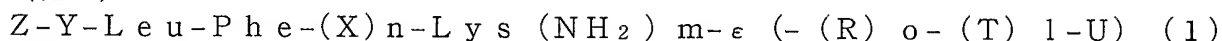
【請求項 8】

金属標識可能なペプチドが白血球結合性化合物である請求項 1 から 7 のいずれかに記載の医療用組成物。

【請求項 9】

金属標識可能なペプチドが、化学式 (1)

(化 1)



(式 (1) 中、

Z はアミノ基の保護基を表し；

Y は M e t または N l e を表し；

(X)_n において、X は 1 個もしくはそれ以上のアミノ酸又は有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、n は 1 または 0 を表し；

(N H₂)_m において、N H₂ は L y s の α 位のカルボキシル基の保護基としてのアミド基、m は 1 または 0 を表し；

ε (- (R) o - (T) 1 - U) において、R は L y s の ε - アミノ基にアミド結合した S e r または T h r、o は 1 または 0、T は 1 個もしくはそれ以上のアミノ酸又は有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、1 は 1 または 0、U は金属標識可能な基を表す；

但し、X と T は同じでも異なってもよい)

で表される化合物である請求項 1 から 8 のいずれかに記載の医療用組成物。

【請求項 10】

化学式 (1) 中、U が、金属標識可能なトリペプチド、ジペプチドメルカプトアシレート、炭素数 8 から 20 の窒素含有環状化合物、炭素数 8 から 20 の窒素含有環状カルボン酸化合物、炭素数 8 から 20 の窒素含有環状カルボン酸化合物の誘導体及び炭素数 4 から 10 のアルキレンアミンカルボン酸から選択される金属標識可能な基である請求項 9 に記載の医療用組成物。

【請求項 11】

化学式 (1) 中、U が - C y s - G l y - A s p、- C y s - A s p - A s p、- C y s - A s

p-Gly、-Cys-Gly-Glu、-Cys-Glu-Glu、-Cys-Glu-Gly、
 -Cys-Gly-Asn、-Cys-Asn-Asn、-Cys-Asn-Gly、-Cys-Gly-Gln、
 -Cys-Gln-Gln、-Cys-Gln-Gly、-Cys-Gly-Lys、
 -Cys-Lys-Lys、-Cys-Lys-Gly、-Cys-Gly-Arg、-Cys-Arg-Arg、
 -Cys-Arg-Gly、-Asp-Asp-メルカプトアセチル、-Gly-Asp-メルカプトアセチル、
 -Gly-Gly-メルカプトアセチル、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン (Cyclen)、
 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン (Cyclam)、
 1, 4, 8, 12-テトラアザシクロペンタデカン、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン (Dioxocycam)、
 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-テトラ酢酸 (TE TA)、
 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸 (DOTA)、
 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸、
 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-酪酸、1, 4, 8, 10-テトラアザシクロドデカン-酪酸、
 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-アミノエチルカルバモイルメチル-4, 7, 10-トリス [R, S]-メチル酢酸 (DO3 MA)、
 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10- α , α' , α'' , α''' -テトラメチル酢酸 (DOTMA)、
 エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA)、
 トリエチレントトラミンヘキサ酢酸及びエチレングリコール-(2-アミノエチル)-N, N, N', N'-テトラ酢酸 (EGTA)
 から選択される金属標識可能な基である請求項9又は10に記載の医療用組成物。

【請求項12】

化学式(1)中、Zがホルミル基である請求項9から11のいずれかに記載の医療用組成物。

【請求項13】

金属標識可能なペプチドが、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)- ϵ (-Ser-Cys-Gly-Asn)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)- ϵ (-Ser-Cys-Gly-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys- ϵ (-Ser-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)- ϵ (-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)- ϵ (-Ser-D-Arg-ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA))、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Asp-Asp-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Gly-Asp-メルカプトアセチル)、及び

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Gly-Gly-メルカプトアセチル)
 から選択される請求項1から12のいずれかに記載の医療用組成物。

【請求項14】

還元剤、pH調整剤、界面活性剤、親水性有機溶媒及び安定化剤から選ばれる1種以上の添加剤を含有する請求項1から13のいずれかに記載の医療用組成物。

【請求項15】

請求項1から14のいずれかに記載の医療用組成物を凍結乾燥することによって得られることを特徴とする凍結乾燥した医療用組成物。

【請求項16】

請求項1から15のいずれかに記載の医療用組成物における金属標識可能なペプチドを金属で標識することにより得られることを特徴とする医療用製剤。

【請求項 17】

金属が、放射性金属又は常磁性金属である請求項 16 に記載の医療用製剤。

【請求項 18】

放射性金属が Tc-99m、In-111、Ga-67、Y-90、Sn-117m、Sm-153、Re-186 及び Re-188 から選択される請求項 17 に記載の医療用製剤。

【請求項 19】

常磁性金属が Gd、Fe、Mn、Cu 及び Dy から選択される請求項 17 に記載の医療用製剤。

【請求項 20】

金属標識可能なペプチドに金属を標識する方法であって、該ペプチドを塩基性有機化合物の水系溶媒に溶解させた後、金属を標識することを特徴とする金属標識方法。

【請求項 21】

金属標識可能なペプチドが、水系溶媒に不溶あるいは難溶なペプチドである請求項 20 に記載の金属標識方法。

【請求項 22】

塩基性有機化合物が塩基性アミノ酸又はイミダゾール環を有する塩基性化合物である請求項 20 又は 21 に記載の金属標識方法。

【請求項 23】

塩基性アミノ酸が、アルギニン、ヒスチジン及びリジンから選択される 1 種以上であることを特徴とする請求項 22 に記載の金属標識方法。

【請求項 24】

イミダゾール環を有する塩基性化合物が、イミダゾールである請求項 22 に記載の金属標識方法。

【請求項 25】

金属が放射性金属又は常磁性金属であることを特徴とする請求項 20 から 24 のいずれかに記載の金属標識方法。

【請求項 26】

放射性金属が Tc-99m、In-111、Ga-67、Y-90、Sn-117m、Sm-153、Re-186 及び Re-188 から選択される請求項 25 に記載の金属標識方法。

【請求項 27】

常磁性金属が Gd、Fe、Mn、Cu 及び Dy から選択される請求項 25 に記載の金属標識方法。

【請求項 28】

請求項 20 から 27 のいずれかの金属標識方法を用いることを特徴とする、金属標識されたペプチドを含有する医療用製剤の製造方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ペプチドの水溶性及び金属標識効率を改善した医療用組成物及び該ペプチドが金属標識された医療用製剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、金属標識可能なペプチドの水溶性及び金属標識効率が改善された、金属標識可能なペプチドを含有する医療用組成物、金属標識された該ペプチドを含有する医療用製剤、並びに該ペプチドの金属標識方法に関する。更に詳しくは、水系溶媒に不溶もしくは難溶な金属標識可能なペプチドと共に塩基性有機化合物を水系溶媒に溶解させて得られる医療用組成物であって室温下での該ペプチドの金属標識効率を向上させることが可能となる医療用組成物、該医療用組成物における該ペプチドを金属により標識することにより得られる医療用製剤、並びに該ペプチドの金属標識方法に関する。

【背景技術】

【0002】

分子内に金属標識可能な基を有するペプチドは、放射性金属や常磁性金属等で標識することにより、診断剤または治療剤の有効成分として用いることができる。

従来、金属標識可能なペプチドは、そのペプチド構造内にアルキル基などの疎水部分が多い分子ほど水系溶媒への溶解性が低く、そのようなペプチドを水系溶媒に溶解するには、ジメチルスルホキシド(DMSO)やジメチルホルムアミド(DMF)などの有機溶媒に予め溶解させておき、必要とする量の水、あるいは緩衝液、またあるいは何らかの水溶液と混合する手法が用いられる。例えば、ペプチドの一つであるホルミル-Met-Leu-Phe(FMLP)は中性の緩衝液に難溶であることが知られている。この化合物を金属標識可能とした化合物ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ヒドラジノニコチン酸(fMLFK-HYNIC)を水系溶媒に溶解するためには、DMSOを用いて溶解した後、必要な緩衝液あるいは水系溶媒を加える必要がある(非特許文献1参照)。

しかしながら、上記方法で溶解させる場合、水系溶媒と混合したときに溶解可能な有機溶媒の溶液に占める割合が減少し、ある一定の有機溶媒濃度を下回ると、白濁や析出などペプチドの不溶化が起こる場合があった。

【0003】

前記した如く金属標識可能なペプチドは、放射性金属で標識を行うことにより、核医学製剤として使用することができるが、DMSO等の有機溶媒を用いて該ペプチドを溶解させる既往の応用例では、その標識に100℃、10分以上の加熱反応条件、あるいは室温30分以上の反応条件が必要とされている。

例えば、fMLFK-HYNICは、室温30分~60分の反応条件が必要とされている(非特許文献1参照)。

FMLPの誘導体であるペプチド群は炎症などの白血球浸潤を伴う疾患の画像化に有用とされるが、完全な水系溶媒でかつ金属標識が室温で可能な条件については明らかではない(非特許文献2、特許文献1参照)。

【0004】

【非特許文献1】van der Laken, C.J. et al., J. Nucl. Med., 38, 8, 1310-1315(1997)

【非特許文献2】Verbeke, K. et al., Nuclear Medicine & Biology, 27巻, 769-779(2000)

【特許文献1】特願2002-282229号明細書

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上記問題点に鑑みてなされたものであり、水に不溶もしくは難溶なペプチドを水系溶媒に溶解させやすくし、かつ非加熱で金属標識が可能な該ペプチドを含有する医療用組成物、金属標識された該ペプチドを含有する医療用製剤、並びに該ペプチドの金属

標識法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、こうした課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、従来の知見からすれば驚くべきことに、塩基性有機化合物にペプチドを添加することにより、有機溶媒や界面活性剤を用いずに該ペプチドを室温で容易に水溶液とすることができ、かつ非加熱で金属標識が可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】

即ち、本発明は、金属標識可能なペプチド及び医薬品添加物として許容されうる塩基性有機化合物を含有することを特徴する医療用組成物に関する。

更に本発明は、上記医療用組成物を凍結乾燥することによって得られることを特徴とする凍結乾燥した医療用組成物に関する。

更に本発明は、上記医療用組成物における金属標識可能なペプチドを金属で標識することにより得られることを特徴とする医療用製剤に関する。

更に本発明は、金属標識可能なペプチドに金属を標識する方法であって、該ペプチドを塩基性有機化合物の水系溶媒に溶解させた後、金属を標識することを特徴とする金属標識方法に関する。

更に本発明は、上記金属標識方法を用いることを特徴とする、金属標識されたペプチドを含有する医療用製剤の製造方法に関する。

【発明の効果】

【0008】

本発明に係る医療用組成物を用いることにより、水系溶媒に不溶もしくは難溶である金属標識可能なペプチドの溶解性が向上し、更に加温することなく該ペプチドを金属標識することが可能となった。本発明に係る金属標識方法を用いることにより、該ペプチドに非加熱条件下で金属を標識させることが可能となった。更に、本発明に係る医療用組成物における該ペプチドを金属で標識した製剤は、例えば、ペプチドとして炎症のイメージングに用いることのできるペプチドを用いた場合には、ペプチドの炎症への集積率が、従来法により調製した組成物と比較して向上するという効果も奏していた。本発明により、例えば、ペプチドとして白血球結合性化合物を用いた場合には、個体の免疫応答反応を伴う白血球浸潤の盛んな部位のイメージングを行うPET画像診断、SPECT画像診断、MRI画像診断あるいは放射線治療等に有用な医療用組成物及び医療用製剤、並びにその標識方法を提供することが可能となった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

以下、本発明の実施の形態について説明する。本明細書で用いるアミノ酸は全て一文字記号もしくは三文字記号で記し、特に断りのない限り左側をN末端側、右側をC末端側として表記した。アミノ酸に続くかっこ内は、特に断りのない限り側鎖に結合したペプチドならびに有機化合物を表すものである。また、かっこ内のアミノ酸配列は全体構造を把握しやすくするために、右側をN末端側、左側をC末端側として表記した。さらに、本明細書において、D体のアミノ酸はD-アミノ酸と記載した。

【0010】

本発明に係る医療用組成物は、具体的には、水系溶媒に不溶あるいは難溶である金属標識可能なペプチドと、医薬品添加物として許容され得る塩基性有機化合物を必須成分として、これらを水系溶媒に溶解することにより調製される。

塩基性有機化合物としては、例えば、塩基性アミノ酸やイミダゾール環を有する塩基性化合物が挙げられる。塩基性アミノ酸としては特に限定されないが、例えばアルギニン、リジン、ヒスチジン、ヒドロキシリジンなどが挙げられ、好ましくはアルギニン、リジン、ヒスチジン、より好ましくはアルギニンを使用する。イミダゾール環を有する塩基性化合物としては特に限定されないが、イミダゾールを例示することができる。塩基性アミノ酸あるいはイミダゾール環を有する塩基性化合物は1種を単独で用いることもできるが、

2種以上を組み合わせて使用してもよい。

【0011】

塩基性有機化合物を金属標識可能なペプチドと共に水系溶媒に溶解する場合、塩基性有機化合物の医療用組成物における濃度は、組成物中 0.1 mM から 1 M の範囲となるように配合するのが好ましい。0.1 mM よりも濃度が薄い場合、標識促進効果が得られないため好ましくなく、1 M よりも濃度が濃い場合、浸透圧毒性が問題となるため好ましくない。また、塩基性有機化合物の量は、使用するペプチドの種類などによって変動するが、通常、金属標識可能なペプチドに対して、モル濃度にして10倍から100万倍の範囲で用いるのが好ましく、1000倍から10万倍の範囲がより好ましい。金属標識可能なペプチドに対して10倍以下のモル濃度では、塩基性有機化合物による十分な溶解促進効果および標識促進効果が得られないため好ましくなく、100万倍以上のモル濃度では、該塩基性有機化合物が過剰量存在したことによる、標識への阻害作用があるため好ましくない。

上記濃度範囲において、組成物として好ましい溶液の pH は 8~12 であり、より好ましくは pH 8.5~12 である。pH が 8 より酸性の場合、塩基性有機化合物による溶解促進効果が損なわれるため好ましくなく、pH 12 よりもアルカリ性の場合、生体へ悪影響を与える恐れがあるため好ましくない。

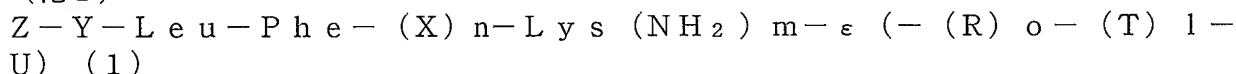
【0012】

本発明で用いる金属標識可能なペプチドは、具体的には、水系溶媒に不溶もしくは難溶なペプチドであり、診断薬もしくは治療用医薬品の有効成分として利用可能なペプチドであることが好ましく、アミノ酸 30 残基以下又は分子量 4500 以下であるポリアミノ酸化合物がより好ましい。その構造中にアミノ基及びカルボニル基を含んでいてもよい。該ペプチドは、金属標識が可能である限り特に限定はされないが、炎症等の診断に用いる場合には、例えば白血球結合性化合物を用いることができる。

【0013】

本発明に用いるペプチドとしては、下記式 (1)

(化1)



で表される化合物が好適に用いられる。ここで、化学式 (1) は、白血球のホルミルペプチド受容体との結合部位 $Z-Y-Leu-Phe-$ 、全白血球中の単球、リンパ球への結合率を向上させる結合部分 $-(R)o-$ 、放射性金属、常磁性金属を標識可能な構造 $-U-$ 、およびこれらを結合するスペーサー $-(X)_n-$ 、 $-Lys(NH_2)_m-$ および $-(T)1-$ よりなっている。

化学式 (1) 中、Z はアミノ基の保護基を表し、Y は Met または Nle を表し、 $(X)_n$ において、X は 1 個もしくはそれ以上のアミノ酸又は有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、n は 1 または 0 を表し、 $(NH_2)_m$ において、 NH_2 は Lys の α 位のカルボキシル基の保護基としてのアミド基、m は 1 または 0 を表し、 $\epsilon(-(R)o-(T)1-U)$ において、R は Lys の ϵ -アミノ基にアミド結合した Ser または Thr、o は 1 または 0、T は 1 個もしくはそれ以上のアミノ酸又は有機合成可能な化合物よりなるスペーサー、1 は 1 または 0、U は金属標識可能な基を表す。但し、X と T は同じでも異なっているもよい。

【0014】

化学式 (1) 中、U については、金属標識が可能である限り特に限定されないが、好ましくは、複数のアミノ酸より成る配位子、より具体的には、金属標識可能なトリペプチド、ジペプチドメルカプトアシレート、炭素数 8 から 20 の窒素含有環状化合物、炭素数 8 から 20 の窒素含有環状カルボン酸化合物、炭素数 8 から 20 の窒素含有環状カルボン酸化合物の誘導体、炭素数 4 から 10 のアルキレンアミンカルボン酸などが挙げられる。より具体的には、例えば、 $-Cys-Gly-Asp$ 、 $-Cys-Asp-Asp$ 、 $-Cys-Asp-Gly$ 、 $-Cys-Gly-Glu$ 、 $-Cys-Glu-Glu$ 、 $-Cys-Glu-Gly$ 、 $-Cys-Gly-Asn$ 、 $-Cys-Asn-Asn$ 、 $-Cys-Asn-Gly$ 、 $-Cys-G$

ly-Gln、-Cys-Gln-Gln、-Cys-Gln-Gly、-Cys-Gly-Lys、-Cys-Lys-Lys、-Cys-Lys-Gly、-Cys-Gly-Arg、-Cys-Arg-Arg、-Cys-Arg-Glyなどの金属標識可能なトリペプチド； -Asp-Asp-メルカプトアセチル、-Gly-Asp-メルカプトアセチル、-Gly-Gly-メルカプトアセチルなどのジペプチドメルカプトアセチレート； 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン (Cyclen)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン (Cyclam)、1, 4, 8, 12-テトラアザシクロペンタデカン、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン (Dioxocycam) などの炭素数8から20の窒素含有環状化合物； 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-1, 4, 8, 11-テトラ酢酸 (TETA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N'',N'''-テトラ酢酸 (DOTA)、1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン-5, 7-ジオン-N,N',N'',N'''-テトラ酢酸、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-酪酸、1, 4, 8, 10-テトラアザシクロドデカン-酪酸などの炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物； 1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1-アミノエチルカルバモイルメチル-4, 7, 10-トリス [R, S]-メチル酢酸 (DO3MA)、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10- α , α' , α'' , α''' -テトラメチル酢酸 (DOTMA) などの炭素数8から20の窒素含有環状カルボン酸化合物の誘導体； エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA)、ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA)、トリエチレントトラミンヘキサ酢酸、エチレングリコール-(2-アミノエチル)-N, N, N', N'-テトラ酢酸 (EGTA) などの炭素数4から10のアルキレンアミンカルボン酸などから選択される金属標識可能な基を用いることができる。

【0015】

化学式(1)で表される具体的な化合物としては、化学式(1)中、Zがホルミル基であるものが好ましく、例えば、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)- ϵ (-Ser-Cys-Gly-Asn)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)- ϵ (-Ser-Cys-Gly-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys- ϵ (-Ser-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)- ϵ (-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)- ϵ (-Ser-D-Arg-ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA))、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)- ϵ (-Ser-ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA))、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Asp-Asp-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Gly-Asp-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Gly-Gly-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-Asp-Gly-メルカプトアセチル)、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys- ϵ (-ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA))、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ヒドラジノニコチン酸などが挙げられる。

【0016】

更に好ましくは、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂) -ε (-Ser-Cys-Gly-Asn)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂) -ε (-Ser-Cys-Gly-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys-ε (-Ser-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂) -ε (-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp)、

N-ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂) -ε (-Ser-D-Arg-ジエチレントリアミンペンタ酢酸 (DTPA))、

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε (-Asp-Asp-メルカプトアセチル)

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε (-Gly-Asp-メルカプトアセチル)

N-ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-ε (-Gly-Gly-メルカプトアセチル)

などが挙げられる。

化学式(1)に記載の化合物を本発明に用いる場合には、金属標識可能な基を、適当な保護基で保護したものをを用いることもできる。

【0017】

上記した白血球結合性化合物などの金属標識可能なペプチドは、以下に説明する方法により合成することができる。

(1) 全てアミノ酸から構成される場合は、アプライドバイオシステムズ社製ペプチド自動合成機等の汎用的に使用されているペプチド自動合成装置により Boc 法、あるいは Fmoc 法等により合成することができる。合成された複合体は、固相用樹脂担体に結合した状態から脱保護基と樹脂担体切り放しを同時に行い、その後、逆相系カラム等を用いた高速液体クロマトグラフ法(以下、HPLC法という)にて精製することができる。その他、ペプチド液相合成法により調製してもよく、また、動物等から採取してもよい。

【0018】

(2) 非アミノ酸化合物を含んでいる場合は、その多くの場合、上記した同様の方法によって合成できる。例えば、固相用樹脂担体に Lys 残基またはその保護誘導体を結合させ、その N 末端に X のアミノ酸残基またはその保護誘導体、あるいはスパーサーとしての機能を有する化合物またはその保護誘導体、Phe またはその保護誘導体、Leu またはその保護誘導体、Y のアミノ酸またはその保護誘導体を順次結合させ、続いて固相用樹脂担体に結合した Lys の側鎖である ε アミノ基を活性化させて、R の Ser あるいは Thr またはその保護誘導体を結合させ、それにスパーサー T のアミノ酸またはその保護誘導体、あるいはスパーサーとしての機能を有する化合物またはその保護誘導体、次いで、U の金属標識可能な基となり得る化合物またはその保護誘導体を結合させ、その後に樹脂担体から合成された目的とする上記式(1)の合成物を切り放すことによって合成できる。

他の金属標識可能なペプチドも上記方法を採用することにより容易に合成することができる。

【0019】

本発明の医療用組成物における金属標識可能なペプチドの使用量は、通常、目的とする診断および治療に好ましいとされる範囲で使用することができる。この範囲は安全性において許容されうる範囲の量であることが望ましく、加えて受容体に作用するペプチドを用いる場合は、目的とする受容体と同等か、少ない量で用いることが望ましい。より具体的なペプチドの使用量は、好ましくは 0.1 nM から 10 μM の濃度の範囲である。

【0020】

本発明の医療用組成物は、上記した金属標識可能なペプチドを、塩基性有機化合物と共

に、水系溶媒、具体的には、滅菌水に必要な応じて、他の有機溶媒などを添加した溶媒に、溶解することにより調製される。必要に応じて所望とする添加剤をさらに加えることができる。添加剤としては、例えば、界面活性剤、親水性有機溶媒、還元剤、pH調整剤、安定化剤などを挙げることができる。

【0021】

界面活性剤としては特に限定はされないが、例えば、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタントリステアレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート、ポリエチレングリコール200、ポリエチレングリコール300、ポリエチレングリコール600、ポリエチレングリコール1000およびポリエチレングリコール1540などの非イオン性界面活性剤を挙げることができ、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートを使用するのが好ましい。界面活性剤の添加量は、好ましくは医療用組成物中 0.01~1 重量%であり、より好ましくは 0.05~0.5 重量%である。

親水性有機溶媒としては特に限定されないが、例えば、エタノール、プロパノール、ブタノール、アセトニトリル、アセトン、メチルエチルケトンなどの極性有機溶媒を挙げることができる。親水性有機溶媒の添加量は、好ましくは医療用組成物中 0.1~10 重量%であり、より好ましくは 0.2~1 重量%である。

還元剤は、標識される金属が酸化されるのを防ぐために添加される。還元剤としては特に限定されないが、例えば、塩化第一スズ、アスコルビン酸、水素化ホウ素ナトリウムなどを挙げることができる。還元剤を添加する際の濃度は、医療用組成物中 0.01 mM~10 mM となるように添加することが好ましく、さらに好ましくは、0.05 mM~1 mM の範囲で添加する。

pH調整剤としては特に限定されないが、例えば、塩酸、酢酸、トリフルオロ酢酸（以下、「TFA」とする）、クエン酸、リン酸、アスコルビン酸、水酸化ナトリウム、アンモニアなどを挙げることができる。

安定化剤としては特に限定されないが、例えば、アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、p-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸ナトリウム、ゲンチシン酸、ゲンチシン酸ナトリウムなどを挙げることができる。安定化剤を添加する際の濃度は、組成物中 0.1 mM~1 M となるように添加することが好ましく、さらに好ましくは、5 mM~500 mM の範囲で添加する。

【0022】

本発明に係る医療用組成物は、水系溶媒に金属標識可能なペプチドと塩基性有機化合物が溶解した水系溶液の形態で用いることもでき、また、水系溶液の形態にある医療用組成物を凍結乾燥して、凍結乾燥の形態とすることもできる。凍結乾燥することにより、キットやその他の形態の診断薬や治療用医薬品として用いることが容易に可能となり、注射剤の最終原料としても容易に用いることができる。凍結乾燥する場合には、水系溶媒に金属標識可能なペプチドと塩基性有機化合物が溶解した水系溶液の形態で用いる医療用組成物を、通常の方法により凍結乾燥することができる。

水系溶液の形態あるいは凍結乾燥した形態にある本発明の医療用組成物は、金属などを含む標識用試薬などと共に、診断薬あるいは治療用医薬品として、供することができる。

【0023】

本発明の医療用組成物における金属標識可能なペプチドは、効率良く金属で標識することができ、金属で標識することにより調製された医療用製剤は、例えば、金属標識可能なペプチドとして、白血球結合性化合物などの炎症部位へのイメージングに利用できるペプチドを用いた場合には、ペプチドの作用により免疫反応を伴う炎症部位に集積し、標識された金属によって当該部位を画像化することができる。より具体的には、本発明に係る医療用製剤を放射性診断剤並びにMRI造影剤として用いることにより、かかる炎症部位を画像化することが可能である。また、本発明は画像化のみならず、適切な放射性金属を選択することにより、放射性治療剤として用いることができる。

【0024】

放射性診断剤として用いる場合には、本発明の医療組成物中の金属標識ペプチドを $Tc-99m$ 、 $In-111$ 、 $Ga-67$ 、 $Sn-117m$ 、 $Sm-153$ 、 $Re-186$ などの SPECT 用放射性金属または、 $Cu-64$ 、 $Ga-68$ などの PET 用放射性金属で標識した放射性金属標識ペプチドとするのが好ましい。MRI 造影剤として用いる場合には、該ペプチドに Cu 、 Fe 、 Mn 、 Gd 、 Dy などの常磁性金属を配位させた常磁性金属標識化ペプチドとするのが好ましい。放射性治療剤として用いる場合には、該ペプチドを $Y-90$ 、 $Re-186$ または $Re-188$ などの放射性金属で標識した放射性金属標識ペプチドとするのが好ましい。

【0025】

該ペプチドを金属、例えば放射性金属又は常磁性金属で標識する方法としては、種々の方法を用いることができる。例えば、 $Tc-99m$ 、 $Re-186$ および $Re-188$ で標識する場合は、本発明の医療用組成物中に塩化第一スズ等の安定量の医薬品添加物として許容されうる還元剤を加え、過テクネチウム酸ナトリウム溶液、または過レニウム酸ナトリウム溶液と混合する常套の方法により標識化合物を調製することができる。 Cu 、 $Cu-64$ 、 Fe 、 Mn 、 Gd 、 $In-111$ 、 $Sn-117m$ 、 $Sm-153$ 、 Dy で標識する場合は、本発明に係る医療用組成物と Cu 、 $Cu-64$ 、 Fe 、 Mn 、 Gd 、 $In-111$ 、 $Sn-117m$ 、 $Sm-153$ 、 Dy イオンを含む弱酸性水溶性溶液とを混合することで調製できる。この場合、最終 pH が 8 以上となるよう pH の調整をすることが望ましい。 $Ga-67$ 、 $Ga-68$ または $Y-90$ で標識する場合は、本発明に係る医療用組成物と $Ga-67$ 、 $Ga-68$ または $Y-90$ イオンを含む弱酸性ないし弱アルカリ性の水溶性溶液とを混合することにより行うことが可能である。この場合、最終 pH が 8 以上となるよう pH の調整をすることが望ましい。

金属で標識する際の条件としては、室温で 5 分～24 時間、好ましくは 5～60 分、より好ましくは 10～30 分、攪拌や振倒する等の条件を用いることができる。

【0026】

放射性金属または常磁性金属で標識されたペプチドを含有する医療用製剤は、必要に応じて薬学的に許容される添加物を更に添加して、好ましい放射性診断剤、放射性治療剤とすることができる。かかる添加物としては、薬学的に許容されるアスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、p-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸ナトリウム、ゲンチシン酸、ゲンチシン酸ナトリウム等の安定化剤、水性緩衝液等の pH 調整剤、D-マンニトール等の賦形剤、および放射化学的純度を改良するのに役立つクエン酸、酒石酸、マロン酸、グルコン酸ナトリウム、グルコヘプトン酸ナトリウム等が挙げられる。

【0027】

放射性金属あるいは常磁性金属で標識したペプチドを含む本発明の医療用製剤を、放射性診断剤、放射性治療剤または MRI 造影剤として用いる場合は、静脈内投与等の一般的に用いられる非経口手段により投与でき、その投与量は患者の体重、年齢、適当な放射線イメージング装置、MRI 測定装置および対象疾患状態等の諸条件を考慮して決定される。

例えば、ヒトを対象とする場合、 $Tc-99m$ 標識ペプチドを用いた診断剤の投与量は、 $Tc-99m$ の放射エネルギーとして 37 MBq～1110 MBq の範囲であり、好ましくは 185 MBq～1110 MBq である。 $Re-186$ または $Re-188$ 標識ペプチドを用いた治療剤の場合は、放射エネルギーとして 37 MBq～18500 MBq の範囲であり、好ましくは 370 MBq～7400 MBq である。 $Y-90$ 標識ペプチドを用いた治療剤の場合は、放射エネルギーとして 37 MBq～3700 MBq の範囲であり、好ましくは 37 MBq～1110 MBq の範囲である。他の放射性金属で標識した標識ペプチドの投与量もほぼ同様である。 Gd 、 Fe 、 Mn 、 Cu 、 Dy などの常磁性金属で標識した標識ペプチドを用いた診断剤の投与量は、MRI 画像化装置の感度、標的組織、投与の特定の様式および使用の意図される効果に応じて適宜選択される。

例えば、ヒトに対して静脈内投与する場合であって、用いる金属が Gd である場合は、通常は、体重当り 0.01～0.3 mmol/kg の範囲の投与量が好ましく用いられる。

【0028】

以下、本発明の実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

実施例において得られた物質の測定方法、使用した試薬等を下記に示す。

(1) ガンマカウンター: 血液内分布は、オートウェルガンマカウンター (アロカ株式会社製) を用いて測定した。体内分布検討は、NaI シングルチャンネルアナライザー (応用光研工業株式会社製) を用いて測定した。

(2) ガンマカメラ: GMS-550U (東芝メディカル株式会社製)、または Millennium MG (GE 横河メディカルシステム株式会社製) を用いて測定した。

(3) 逆相 HPLC: 逆相カラム Cosmosil 5C₁₈-AR-300 (ナカライテスク株式会社製、4.6×150 mm) を用いた。

(4) ペプチド化合物は全て、固相合成法により作製した。

(5) $^{99m}\text{TcO}_4^-$: $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ジェネレーター (商品名; メジテック、日本メジフィジックス株式会社製) を用い、生理食塩液にて溶出したものを用いた。

(6) 試薬はすべて特級試薬以上の製品を用いた。

(7) すべての実験動物は実験に先立ち 1 週間 12 時間毎の明暗サイクル条件下で飼育した。その期間、餌および水は自由に摂取させた。

【0029】

(8) 本実施例に用いたペプチドは、次に記すペプチドを用いた。

ペプチド 1: ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)-e
(-Ser-D-Arg-Asp-Cys-Asp-Asp)

ペプチド 2: ホルミル-Nle-Leu-Phe-Nle-Tyr-Lys (NH₂)-e
(-Ser-D-Arg-DTPA*)

ペプチド 3: ホルミル-Met-Leu-Phe-Lys-e (-Gly-Asp-Ac-S-Bzl)

*: DTPA: ジエチレントリアミンペンタ酢酸

【0030】

(9) ペプチド 1 の合成

ペプチド 1 を、固相合成法により製造し、以下の実施例に用いた。

アプライドバイオシステムズ社製ペプチド合成機 (モデル 430A) を用い、Boc 法により MBHA 樹脂 (p-Methoxy-Benzhydrylamine Resin hydrochloride, 1%Divinylbenzene-polystyrene copolymer) を用いて 0.5 mM スケールの条件で合成を行った。この際 C 末端、Lys 残基の側鎖は Fmoc 基で保護した。ペプチド鎖を伸長、N 末端アミノ基をホルミル化した後、Lys 残基の側鎖 Fmoc 基を 20% ピペリジン/DMF で切断し、側鎖側にペプチド鎖を伸長した。ペプチドの切出しは、無水フッ化水素: p-クレゾール (80:20) 中、-2°C から -5°C において 1.0 時間反応させて行った。

合成したペプチドにつき、HPLC 法 (カラム: YMC-Pack ODS-A SH-365-5 (商品名、株式会社ワイエムシイ製、30×250 mm)、カラム温度: 室温、溶出速度: 20 mL/分、検出器: 紫外可視吸光光度計 (吸収波長: 220 nm)、溶出液 A: 0.1% TFA/精製水、溶出液 B: 0.1% TFA/アセトニトリル、(A/B (80%/20%) → A/B (30%/70%) 90 分)) を用いて主ピークを分取し、凍結乾燥した。得られたペプチドにつき、逆相 HPLC (カラム: Zorbax 300 SB-C18 (商品名、横河アナリティカルシステムズ株式会社製、4.6×150 mm)、カラム温度: 50°C、流速: 1.0 mL/分、検出器: 紫外可視吸光光度計 (吸収波長: 220 nm)、溶出液 A: 0.1% TFA/精製水、溶出液 B: 0.1% TFA/アセトニトリル (A/B (80%/20%) → A/B (30%/70%) 25 分)) を用いて、分析を行った。その結果、得られたペプチドの純度は 93.2% (面積百分率) であった。

なお、MBHA 樹脂のかわりにプレロードレジンをを用いても同様に合成が可能であった。

【0031】

上記精製したペプチドにつき、6 M の塩酸内にて 110°C、22 時間の加水分解を行って各アミノ酸に分解した。L-8800 形日立高速アミノ酸分析計 (商品名、株式会社日立ハイ

テクノロジーズ製)を用い、以下の条件にてアミノ酸組成を求め、ペプチド1と同様のアミノ酸組成を有することを確認した。また、質量分析(以下、ESI-MS)を行い、ペプチド1の理論値と一致することを確認した。

アミノ酸組成分析条件

機種: L-8800形日立高速アミノ酸分析計

クロマト条件

カラムサイズ: 4.6 mm I.D. x 60.0 mm

固定相: 日立カスタムイオン交換樹脂#2622

移動相: クエン酸ナトリウム系緩衝液(4種類及び分析カラム再生用0.2N-NaOH試液)の段階的溶出法

(1) L-8500-PH1: 0.16N, pH 3.3

(2) L-8500-PH2: 0.2N, pH 3.2

(3) L-8500-PH3: 0.2N, pH 4.0

(4) L-8500-PH4: 1.2N, pH 4.9

流速: 0.40 mL/分

カラム温度: 57℃

検出

試薬: (1) ニンヒドリン試液 (2) ニンヒドリン用緩衝液(Ninhydrin Reagent L-8500 Set)

反応試薬流速: 0.35 mL/分

反応装置: 電子加熱反応カラム, 設定温度: 135℃

検出波長: 570 nm および 440 nm

標準アミノ酸

試薬: 味の素 Amino Acid Calibration Mixture

濃度: 各 50 nmol/mL (但し Proは100 nmol/mL)

希釈液: 0.2M Na Citrate Buffer (pH 2.2)

注入量: 40 µL (各アミノ酸 2 nmol, Pro は 4 nmol))

定量計算方法: 面積値による1点絶対検量線法

以下に得られたペプチド1のアミノ酸組成の分析値(分子当たりの個数)及び質量分析の結果を示す。なお、丸かっこ内は、目的ペプチドのアミノ酸組成の理論値を示す。

【0032】

ペプチド1 = A s p : (3) 3.19、S e r : (1) 0.97、T y r : (1) 0.97、P h e : (1) 0.98、L y s : (1) 1.00、NH₃ (1) 1.20、L e u (1)+N l e (2) 2.80、A r g : (1) 1.06、C y s : (1) 0.92

また、得られたペプチド1のESI-MSの分析値を示す。丸かっこ内は、目的ペプチドの分子量の理論値を示す。

ESI-MS:MW = 1514.4 (1514.7)

【実施例1】

【0033】

アルギニンによるペプチドの溶解性

(1) 方法

ペプチド1、ペプチド2及びペプチド3の各100 µgを410 mMのアルギニン溶液(pH1)に加え、全量を700 µLとした。この時のモル濃度は、ペプチド1は94 µM、ペプチド2は99 µM、ペプチド3は161 µMとなる。外観観察により白濁の有無を確認した後、各試料液から200 µLを孔径0.22 µmのフィルター、マイレクス(登録商標) -GV(商品名、日本ミリポア株式会社製)にてろ過し、フィルターろ過前の試料液とフィルターろ過後の試料液をそれぞれ逆相HPLCにて分析し、フィルター前後のペプチドのピーク面積値からピーク面積百分率を求め、溶出率とした。HPLC分析条件を下記に示す。

比較例として、水、ジメチルスルホキシド(DMSO)それぞれに、ペプチド1、ペプチド2およびペプチド3を溶解させ、それぞれ94 µM、99 µM、161 µMのペプチド濃度

とした試料について、同様に検討を行った。

HPLC 条件

カラム: Cosmosil 5C₁₈-AR-300 (ナカライテスク株式会社製、4.6×150 mm)

溶出速度: 1 mL/分

検出: 紫外可視吸光度計 (検出波長: 220 nm)

HPLCシステム: Alliance (日本ウォーターズ株式会社製)

溶出液 A: 0.1% トリフルオロ酢酸 (以下 TFA) / 精製水

溶出液 B: 0.1% TFA / アセトニトリル

濃度勾配: 0 分 (溶出液 B 20 %) → 25 分 (溶出液 B 70 %)

【0034】

(2) 結果

得られた結果を表 1 および図 1 に示す。各ペプチドを溶解後、外観を観察した結果、3 種のペプチドは水では白濁がみられたのに対し、アルギニン水溶液では 3 種のペプチドの全てが無色澄明な外観を示した。これは DMSO の試料溶液と同様な外観を示した。逆相 HPLC を用いた溶出率においては、アルギニンおよび DMSO の各試料溶液のいずれもが、約 100% の溶出率を示した。これらの結果より、DMSO と同様に、アルギニンはペプチドの溶解性を高めていることが確認された。

【0035】

【表 1】

各試料溶液の外観の観察結果及び溶出率

溶媒 ペプチド	外観			溶出率	
	水	アルギニン	DMSO	アルギニン	DMSO
ペプチド 1	白濁	無色澄明	無色澄明	100.8%	98.6%
ペプチド 2	白濁	無色澄明	無色澄明	102.8%	100.9%
ペプチド 3	白濁	無色澄明	無色澄明	101.3%	108.5%

【実施例 2】

【0036】

アルギニン、リジン及びヒスチジンによるペプチド 1 の各 pH における溶解性

(1) 方法

アルギニン、リジンおよびヒスチジンを水に溶解し、アルギニン溶液は 410 mM、リジン溶液は 489 mM、ヒスチジン溶液は 90 mM の濃度にて調製した。これらの溶液に水酸化ナトリウム水溶液および塩酸にて、リジンおよびヒスチジン水溶液は pH 8、9、10、11 に、アルギニン水溶液は pH 8、8.5、9、9.5、10、11 に調整した。続いてペプチド 1 をこれら水溶液に加えて 94 μM の濃度にて調製し、外観観察により白濁の有無を確認した。各試料液から 200 μL を孔径 0.22 μm のフィルター、マイレクス (登録商標) -GV (商品名、日本ミリポア株式会社製) にてろ過し、フィルターろ過前の試料液とフィルターろ過後の試料液をそれぞれ逆相 HPLC にて分析し、フィルター前後のペプチド 1 のピーク面積値からピーク面積百分率を求め、溶出率とした。HPLC 分析条件は実施例 1 記載と同じ条件にて実施した。

【0037】

(2) 結果

得られた結果を表 2 に示す。アルギニン水溶液は pH 8 で明らかな白濁が認められた。アルギニン、リジン、及びヒスチジンの各水溶液では pH 8.5 以下では弱い白濁が見られたが、リジン及びヒスチジン水溶液は、pH 8 においても 20% 強の溶出率が認められ、リジン及びヒスチジンは、pH 8 においてもペプチドを溶解させる効果があることが確認された。さらに、アルギニン、リジン、及びヒスチジン水溶液において、pH 9 以上では無色澄明な溶液となり、ペプチドの溶出率も 85% 以上であった。従って、これらの塩基性アミノ酸は、pH 8 以上で、ペプチドの溶解性を奏し得ることが示された。

【0038】

【表2】

アルギニン、リジン及びヒスチジンによるペプチド1の各pHにおける溶出率

	pH 8	pH 8.5	pH 9	pH 9.5	pH 10	pH 11
アルギニン	測定せず(*)	43.8%	93.8%	95.4%	98.8%	100.8%
リジン	21.0%	-	89.0%	-	83.6%	85.9%
ヒスチジン	26.8%	-	85.9%	-	90.7%	96.7%

* 外観観察にて明らかな白濁が認められたため、HPLC 測定を行わなかった

【実施例3】

【0039】

イミダゾールによるペプチド1の各pHにおける溶解性

(1) 方法

イミダゾールを水に溶解し、1 mM の濃度にて調製した。この溶液に塩酸を適量加えることにより、pH 8、8.5、9 に調整した。続いてペプチド1をこれらイミダゾール溶液に加えて 94 μ M の濃度にて調製し、外観観察により白濁の有無を確認した。各試料液から 200 μ L を孔径 0.22 μ m のフィルター、マイレクス（登録商標）-GV（商品名、日本ミリポア株式会社製）にてろ過し、フィルターろ過前の試料液とフィルターろ過後の試料液をそれぞれ逆相 HPLC にて分析し、フィルター前後のペプチド1のピーク面積値からピーク面積百分率を求め、溶出率とした。HPLC 分析条件は実施例1記載と同じ条件にて実施した。

【0040】

(2) 結果

得られた結果を表3に示す。pH 8、8.5、9のいずれの溶液においても無色澄明であり、またpH 8.5、9 以上では 80% 以上の溶出率を示した。よって、ペプチド1に対しイミダゾールは高い溶解性を示すことが確認された。

【0041】

【表3】

イミダゾールによるペプチド1の各pHにおける外観の観察結果及び溶出率

	外観	溶出率
pH 8	無色澄明	64.9 %
pH 8.5	無色澄明	80.8 %
pH 9	無色澄明	99.2 %

【実施例4】

【0042】

各種添加剤によるペプチド1の溶解性

(1) 方法

リン酸水素二ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウム、イミダゾールを水に溶解し、pH 9 の各水溶液を表4に記載の濃度にて調製した。pH調整は塩酸および水酸化ナトリウム水溶液を用いて実施した。秤量したペプチド1に前記の水溶液を加え、94 μ M とし、外観観察により白濁の有無を確認した。また同様に、実施例2で得られた、アルギニン、リジンおよびヒスチジン水溶液に溶解されたペプチド1水溶液についても白濁の有無を確認し、比較対照であるリン酸水素二ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムの各水溶液によるペプチド1試料溶液と比較した。続いて各試料液から 200 μ L を孔径 0.22 μ m のフィルター、マイレクス（登録商標）-GV（商品名、日本ミリポア株式会社製）にてろ過し、フィルターろ過前の試料液とフィルターろ過後の試料液をそれぞれ逆相 HPLC にて分析し、フィルター前後のペプチド

1 のピーク面積値からピーク面積百分率を求め、溶出率とした。また、HPLC 測定後に pH を測定し、pH 実測値とした。HPLC 分析条件は実施例 1 記載と同じ条件にて実施した。

【0043】

【表 4】

各添加剤の試料溶液における濃度

溶媒	添加剤	モル濃度	重量濃度	pH
水	アルギニン	410 mM	71.4mg/mL	9
	ヒスチジン	90 mM	14mg/mL	9
	リジン	489 mM	50mg/mL	9
	リン酸水素二ナトリウム	100 mM	14mg/mL	9
	アスコルビン酸ナトリウム	401 mM	71.4mg/mL	9
	クエン酸二水素ナトリウム	243 mM	71.4mg/mL	9
	イミダゾール	1mM	0.07mg/mL	9

【0044】

(2) 結果

得られた結果を表 5 および図 2 に示す。ペプチド 1 を溶解した結果、3 種の塩基性アミノ酸であるアルギニン、リジンおよびヒスチジンの pH 9 における水溶液は、無色澄明の外観を示し、またイミダゾールもその水溶液を用いたペプチド 1 の試料溶液は無色澄明の外観を示した。

一方、比較対照であるアスコルビン酸ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウムの各水溶液は、ペプチド 1 を添加後白濁を示し、またリン酸水素二ナトリウムの水溶液は、ペプチド 1 を添加後、無色澄明の外観を示したが、HPLC 分析により算出した溶出率は 53.8% という値を示し、3 種の塩基性アミノ酸やイミダゾールと比較して低かった。よって、3 種の塩基性アミノ酸やイミダゾールは、単に pH による溶解性亢進の作用の他に、ペプチド 1 の溶解性を高める作用を有していることが確認された。

【0045】

【表 5】

各種水溶液におけるペプチド 1 の溶液の外観、溶出率および pH 実測値

溶媒	添加剤	pH	溶出率	調製後 pH	外観
水	アルギニン	9	93.8%	8.97	無色澄明
	ヒスチジン	9	85.9%	9.00	無色澄明
	リジン	9	89.0%	8.99	無色澄明
	リン酸水素二ナトリウム	9	53.8%	8.85	無色澄明
	アスコルビン酸ナトリウム	9	測定せず(*)	9.10	白濁
	クエン酸二水素ナトリウム	9	測定せず(*)	9.05	白濁
	イミダゾール	9	99.2%	9.10	無色澄明

* 外観観察にて明らかな白濁が認められたため、HPLC 測定を行わなかった

【実施例 5】

【0046】

実施例 5

アルギニンによる Tc 99m 標識促進効果

(1) 方法

実施例 2 で得られた pH 10 のアルギニン水溶液にペプチド 1 を溶解し、 $9.4\mu\text{M}$ のペプチド/アルギニン溶液を調製した。 0.01 M 塩酸 10 mL に塩化第一スズ溶液 5 mg を加えた溶液の $25\mu\text{L}$ をペプチド/アルギニン溶液 $700\mu\text{L}$ に加え、速やかに Tc-99m-過

テクネチウム酸ナトリウム（以下 99mTcO_4^- ）溶液 $0.6\sim 1.0\text{ GBq}$ を加え、全量を 1 mL とした。標識操作後のペプチド濃度は $6.6\mu\text{M}$ に希釈された。数秒間の振倒後、室温で反応させた。標識操作後 10 分、90 分において、その一部を取り、HPLC、TLC により各 $\text{Tc}-99\text{m}$ 標識率を求めた。HPLC、TLC 分析は下記の条件で実施した。

比較対照として、ジメチルスルホキシド（DMSO）にペプチド 1 を溶解した後、 $\text{pH } 10$ の 100 mM リン酸緩衝液（以下 PB）で 10 倍に希釈し、ペプチドの終濃度を $9.4\mu\text{M}$ としたペプチド/DMSO/PB 溶液、および PB にペプチド 1 を溶解し、ペプチドの終濃度を $9.4\mu\text{M}$ としたペプチド/PB 溶液をペプチド/アルギニン溶液と同様に標識を行い、HPLC、TLC により各 $\text{Tc}-99\text{m}$ 標識率を求めた。標識操作後のペプチド濃度は $6.6\mu\text{M}$ に希釈された。

HPLC 条件

カラム: Cosmosil 5C₁₈-AR-300（ナカライテスク株式会社製、 $4.6\times 150\text{ mm}$ ）

溶出速度: 1 mL/分

検出: 紫外可視吸光光度計（検出波長: 220 nm ）

放射能検出器: STEFFI NaIシンチレーター（Raytest社製）

溶出液 A: 0.1% TFA/精製水

溶出液 B: 0.1% TFA/アセトニトリル

濃度勾配: 0 分（溶出液 B 20%） \rightarrow 25 分（溶出液 B 70%）

TLC 条件

プレート: Silicagel 60 F254（メルク株式会社製）

展開溶媒: 28% アンモニア水/アセトニトリル = $1/2$

放射能検出器: Gita NaIシンチレーター（Raytest社製）

【0047】

(2) 結果

得られた結果のピーク面積から算出された放射化学的純度を表 6 に示す。 410 mM のアルギニン水溶液は、HPLC 分析において標識後 10 分に放射化学的純度 90% 以上、標識後 90 分まで放射化学的純度 95% 以上を示した。さらに TLC 分析においても標識後 10 分および 90 分では放射化学的純度 85% 以上を示し、加熱を必要とせずに、高い $\text{Tc}-99\text{m}$ 標識率と高い標識安定性が示された。

一方、比較対照であるペプチド/DMSO/PB 溶液及びペプチド/PB 溶液の放射化学的純度は、ペプチド/DMSO/PB 溶液が HPLC 分析で標識後 10 分: 72.0%、標識後 90 分: 75.4%、および TLC 分析で標識後 10 分: 45.7%、標識後 90 分: 41.9% を示し、またペプチド/PB 溶液が HPLC 分析で標識後 10 分: 55.3%、および TLC 分析で標識後 10 分: 28.0%、標識後 90 分: 33.6% を示した。

以上の結果より、いずれの時間点においても、ペプチド/アルギニン溶液は比較対照よりも放射化学的純度が高いことが確認された。よって、アルギニン添加を伴う溶解法を用いることで、非加熱で高い標識率を達成することができ、かつ調製した標識体の安定性も向上することが示された。

【0048】

【表 6】

各溶媒 ($\text{pH}10$) における放射化学的純度 (%) とその経時的変化

	アルギニン		DMSO/リン酸緩衝液		リン酸緩衝液	
	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC
10 分	92.5	87.2	72.0	45.7	55.3	28.0
90 分	96.5	88.6	75.4	41.9	—	33.6

【実施例 6】

【0049】

各種アルギニン濃度における Tc 99m 標識とその安定性の確認

(1) 方法

アルギニン 12.5、25 および 50 mg を秤とり、水に溶解し、塩酸にて pH 10 に調整し、全量をそれぞれ 700 μ L にした。このときのモル濃度はそれぞれ 102.5 mM、205 mM、410 mM である。これらアルギニン水溶液にペプチド 1 を溶解させ、9.4 μ M のペプチド/アルギニン溶液をそれぞれ調製した。0.01 M 塩酸 10 mL に塩化第一スズ溶液 5 mg を加えた溶液の 25 μ L をそれぞれのペプチド/アルギニン溶液に加え、速やかに 99mTcO₄⁻ 溶液 0.6~1.0 GBq を加え、全量を 1 mL とした。数秒間の振倒後、室温で反応させた。標識操作後 30 分、90 分、180 分、360 分、24 時間、30 時間において、その一部を取り、実施例 5 記載の条件による TLC 分析にて、放射化学的純度を求めた。

【0050】

(2) 結果

ピーク面積から算出された放射化学的純度を表 7 に示す。標識後 30 時間までの全ての結果において放射化学的純度 80% 以上を示し、さらにアルギニン濃度が 205 mM 以下では、標識後 30 時間まで放射化学的純度 85% 以上を示した。よって、アルギニンを使用する溶解法は、アルギニンの濃度に依存することなく、加熱を必要とせずに、高い Tc 99m 標識率と高い標識安定性を示す Tc 99m 標識されたペプチドを供することが可能であることが確認された。

【0051】

【表 7】

各種アルギニン濃度における放射化学的純度 (%) とその経時的変化

経過時間	各種アルギニン濃度における放射化学的純度 (%)		
	102.5 mM	205mM	410 mM
30 分	93.3 %	92.0 %	91.6 %
90 分	92.6 %	90.8 %	89.5 %
180 分	92.6 %	89.7 %	87.1 %
360 分	91.2 %	89.7 %	85.7 %
24 時間	88.9 %	88.3 %	86.5 %
30 時間	89.8 %	87.3 %	84.9 %

【実施例 7】

【0052】

アルギニン添加により調製した Tc 99m-ペプチド 1 溶液のウサギ感染症モデルにおけるイメージング

(1) 方法

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の約 10⁸ 個の生菌を生理食塩液 1 mL に懸濁させ、その内の 100 μ L をウサギ (ニュージーランドホワイト系、オス、体重約 2 kg) の右大腿部に筋肉内投与し、24 時間経過後、明らかに炎症が認められたモデルウサギにペントバルビタール麻酔を施し、実施例 5 で得られた Tc 99m で標識したペプチド 1 (アルギニン/非加熱) の 37~74 MBq を耳静脈内投与し、投与後 5 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間及び 5 時間にガンマカメラにてイメージを撮像した。また比較対照としてペプチド/ジメチルホルムアミド (DMF)/水により調製し加熱した Tc 99m 標識ペプチド 1 (DMF/加熱) を同様に投与し検討をおこなった。比較対照の調製法は次の通りである。134 mM のグルコヘプトン酸 300 μ L と 2.6 mM の塩化第一スズ溶液 50 μ L の混合液を含有するバイアル中に 99mTcO₄⁻ 溶液 1.1~3.0 GBq を加え、全量を 1.35 mL とした。時折転倒させることにより攪拌しながら室温で 30 分間反応させ、その一部を取り、セルロースアセテート膜電気泳動法にて Tc-99m-グルコヘプトン酸の Tc-99m 標識率が 95% 以上であることを確認した。次に、ペプチド 1 を、ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解し 943 μ M に調製し、ついで水を用いて 10 倍に希釈し 94 μ M

の濃度に調製した。この溶液 700 μ L に、Tc-99m グルコヘプトン酸溶液 300 μ L を各々加え、混合攪拌し、100℃から 120℃に加熱して 10 分間反応させた。標識後、その一部を取り、HPLC により各 Tc-99m 標識率を求めた。HPLC 条件は以下の通りである。

HPLC 条件

カラム: Puresil 5 μ m C18 (Millipore社製、4.6×150 mm)

溶出速度: 1 mL/分

検出: 紫外可視吸光光度計 (検出波長: 220 nm)

放射能検出器: STEFFI NaIシンチレーター (Raytest社製)

溶出液 A: 0.1% TFA/精製水

溶出液 B: 0.1% TFA/アセトニトリル

濃度勾配: 0 分 (溶出液 B 20%) → 25 分 (溶出液 B 70%)

【0053】

(2) 結果

得られた結果の代表図を、図 3 および図 4 に示す。イメージ上に関心領域を設定し、全身カウントに対する各関心領域 1000 画素あたりのカウントの割合 (%投与量/K pixel) を求めた結果を表 8 および図 5 に示す。その結果、従来技術の Tc-99m-ペプチド 1 (DMF/加熱) および、本発明の Tc-99m-ペプチド 1 (アルギニン/非加熱) は、いずれも感染部位を明瞭に描出することができ、また両者の描出パターンは共通していた。炎症への集積は全ての時間点において本発明にかかる処方、すなわち、アルギニンを添加し非加熱条件下で調製した溶液が、従来法、すなわち、DMF を添加し 100℃ 以上に加熱して調製した溶液よりも、上回っており、投与後 1 時間の 1.59 ± 0.32 %投与量/K pixel から、投与後 5 時間では 2.62 ± 0.55 %投与量/K pixel と増大した。よって、本発明である、白血球結合性化合物をアルギニンを用いて溶解し非加熱により Tc-99m 標識する方法は、従来技術で得られる標識体よりも炎症集積性の高い標識体を提供することができることが確認された。

【0054】

【表 8】

ウサギ感染症モデルにおける Tc-99m 標識ペプチド 1 の炎症集積 (%投与量/K pixel) (n=3、平均値±標準偏差値)

標識方法	投与後経過時間					
	5 分	1 時間	2 時間	3 時間	4 時間	5 時間
アルギニン/非加熱	1.74 ± 0.22	1.59 ± 0.32	1.77 ± 0.25	2.01 ± 0.29	2.32 ± 0.56	2.62 ± 0.55
DMF/加熱	0.95 ± 0.24	0.91 ± 0.14	1.09 ± 0.22	1.52 ± 0.27	1.76 ± 0.39	1.84 ± 0.27

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図 1】 ペプチド 1、ペプチド 2、及びペプチド 3 の溶出率を示す図。

【図 2】 pH 9 における各種添加剤添加によるペプチド 1 の溶出率の比較を示す図。

【図 3】 ジメチルホルムアミド (DMF) を用いて加熱標識した Tc-99m 標識ペプチド 1 のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す図。

【図 4】 アルギニンを用いて非加熱標識した Tc-99m 標識ペプチド 1 のウサギ感染症モデルにおけるイメージを示す図。

【図 5】 異なる標識法で標識した Tc-99m 標識ペプチド 1 のウサギ感染症モデルにおける炎症集積 (%投与量/K pixel) を示す図。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nihon Medi-Physics Corporation Limited

<120> Medical Composition Containing Metal Chelating Peptide which is improved in Water Solubility and Chelating Efficacy of the Peptide

<130> DA-03635

<160> 12

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<223> Metal Chelating Peptide

<400> 1

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Cys Gly Asn
1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<223> Metal Chelating Peptide

<400> 2

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Cys Gly Asp
1 5 10

<210> 3

<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> FORMYLATION
<222> 1

<200>
<221> AMIDATION
<222> 6
<223> Metal Chelating Peptide

<400> 3
Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Cys Asp Asp
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> FORMYLATION
<222> 1

<200>
<221> AMIDATION
<222> 6
<223> Metal Chelating Peptide

<400> 4
Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Arg Asp Cys Asp Asp
1 5 10

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> FORMYLATION
<222> 1

<200>
<221> AMIDATION
<222> 6

<220>
<221> ACETYLATION

<222> 8

<223> Metal Chelating Peptide

<400> 5

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser Arg

1

5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 6

<200>

<221> ACETYLATION

<222> 7

<223> Metal Chelating Peptide

<400> 6

Nle Leu Phe Nle Tyr Lys Ser

1

5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMULATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 4

<200>

<221> THIOLEST

<222> 6

<223> Metal Chelating Peptide

<400> 7

Met Leu Phe Lys Asp Asp

1

5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> FORMYLATION
<222> 1

<200>
<221> AMIDATION
<222> 4

<200>
<221> THIOLEST
<222> 6
<223> Metal Chelating Peptide

<400> 8
Met Leu Phe Lys Gly Asp
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> FORMYLATION
<222> 1

<200>
<221> AMIDATION
<222> 4

<200>
<221> THIOLEST
<222> 6
<223> Metal Chelating Peptide

<400> 9
Met Leu Phe Lys Gly Gly
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> AMIDATION

<222> 4

<200>

<221> THIOLEST

<222> 6

<223> Metal Chelating Peptide

<400> 10

Met Leu Phe Lys Asp Gly

1

5

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> ACETYLATION

<222> 4

<223> Metal Chelating Peptide

<400> 11

Met Leu Phe Lys

1

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> FORMYLATION

<222> 1

<200>

<221> NICOTHYNATE

<222> 4

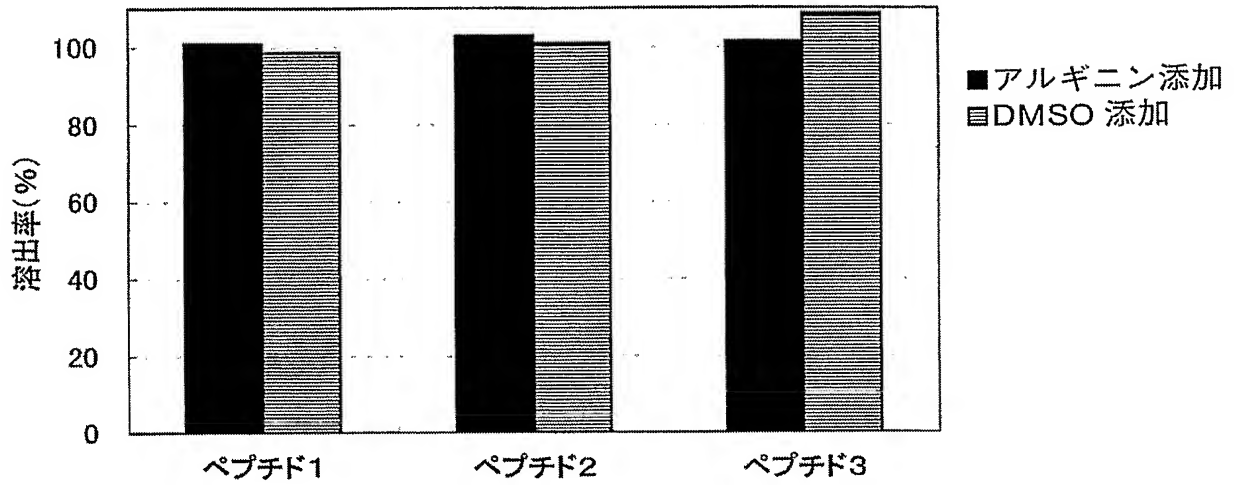
<223> Metal Chelating Peptide

<400> 12

Met Leu Phe Lys
1

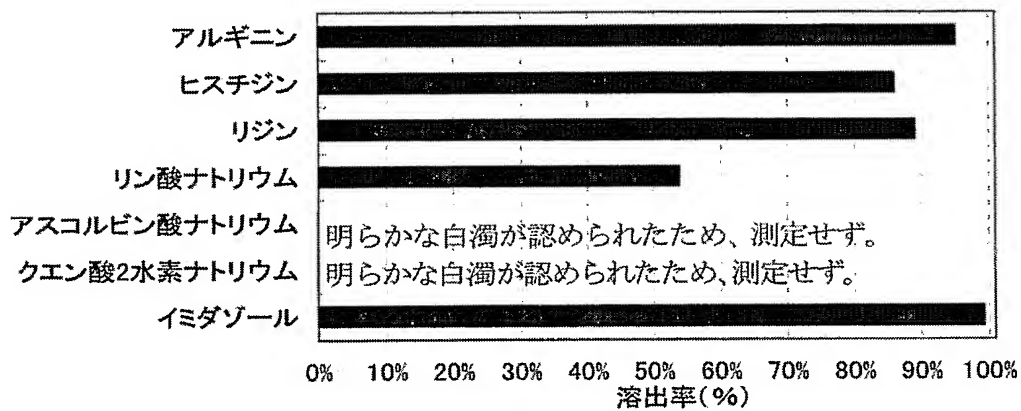
1

【書類名】 図面
【図 1】



ペプチド1、ペプチド2およびペプチド3の溶出率

【図 2】



pH 9 における各種添加剤添加によるペプチド1の溶出率の比較

【図 3】

(投与後 60 分)



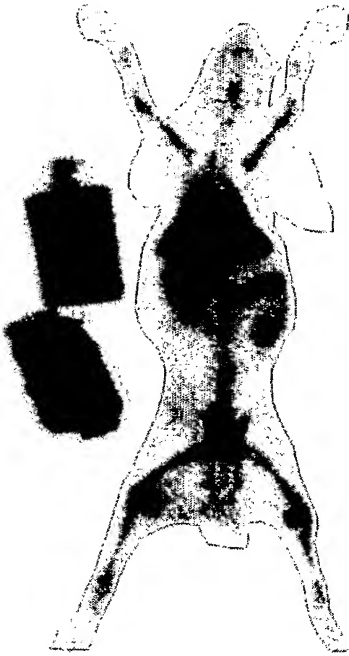
(投与後 300 分)



ジメチルホルムアミド (DMF) を用いて加熱標識した
Tc99m 標識ペプチド 1 のウサギ感染症モデルにおけるイメージ

【図 4】

(投与後 60 分)

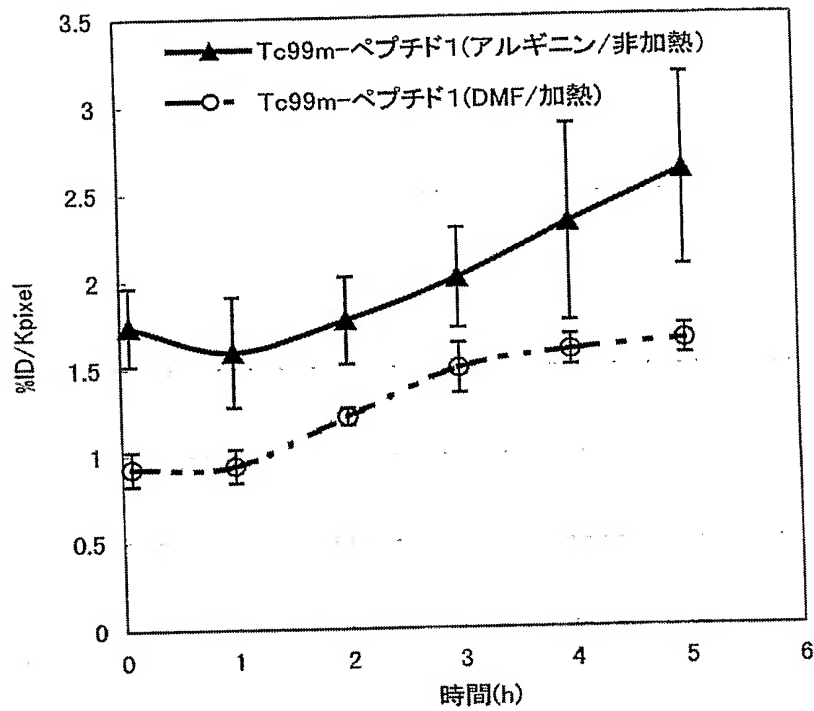


(投与後 300 分)



アルギニンを用いて非加熱標識したTc99m標識ペプチド1の
ウサギ感染症モデルにおけるイメージ

【図 5】



異なる標識法で標識したTc99m標識ペプチド1の
ウサギ感染症モデルにおける炎症集積 (%ID/Kpixel)

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 水に難溶な金属標識可能なペプチドを水系溶媒に溶解させやすくし、かつ非加熱で金属を標識することが可能な医療用組成物並びにその金属標識方法の提供。

【解決手段】 金属標識可能なペプチドを溶解させる水系溶媒に予め塩基性有機化合物を溶解させておくことによって、ペプチドの溶解性が向上し、非加熱で金属標識が可能となる。従って、金属標識可能なペプチド及び医薬品添加物として許容されうる塩基性有機化合物を含有する医療用組成物を利用することにより、金属標識可能なペプチドの溶解性が向上し、非加熱で金属標識が可能となる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 0 8 9 6 2 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 2 3 0 2 5 0]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

兵庫県西宮市六湛寺町 9 番 8 号

氏 名

日本メジフィジックス株式会社